

© КРЫЛОВ А.Ю., 2011

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СИНХРОННОГО ПЕРВИЧНО-МНОЖЕСТВЕННОГО РАКА ЖЕЛУДКА

КРЫЛОВ А.Ю.

ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования»

Резюме. Проведен сравнительный иммуногистохимический анализ выраженности экспрессии маркеров апоптоза и пролиферации (p53, Bcl 2 и Ki67) в клетках синхронных первично-множественных карцином желудка (n=21), сочетающихся с раком толстой кишки. В качестве контроля использовано 21 наблюдение рака желудка с пятилетней выживаемостью, без рецидивов и множественности после резекции желудка. Установлено, что значение показателя пролиферации Ki67 и апоптоза Bcl 2 в исследуемой группе было выше, чем в контрольной.

При клинимоρφологическом анализе экспрессии рецепторов эпидермального фактора роста (HER2/neu) в клетках резецированных карцином желудка (n=52) гиперэкспрессия этого маркера иммуногистохимически была выявлена в 23% случаев. Эти случаи были представлены опухолями с гистологическим строением аденокарциномы (кишечный тип). В опухолях диффузного типа гиперэкспрессия HER2/neu нами не выявлена. Полученные данные свидетельствуют об экономической целесообразности проведения дорогостоящего скрининга гиперэкспрессии HER2/neu для решения вопроса о возможности таргетной терапии герцептином, прежде всего в опухолях с гистологическим строением аденокарциномы.

Ключевые слова: иммуногистохимический анализ, маркеры апоптоза и пролиферации (p53, Bcl 2 и Ki67), синхронные первично-множественные карциномы желудка, рецепторы эпидермального фактора роста (HER2/neu) при раке желудка.

Abstract. Comparative immunohistochemical analysis of the expression of markers of apoptosis and proliferation (p53, Bcl 2 and Ki67) in the cells of synchronous multifocal stomach carcinomas (n=21) associated with colon cancer was made. As the control group 21 observations of stomach carcinoma with five-year survival rate, without backsets and multiplicity after stomach resection were used. It was determined that the value of proliferation index Ki67 and apoptosis Bcl 2 in the investigated group was higher than that in the control one.

At clinicomorphological analysis of the expression of epidermal growth factor receptors (HER2/neu) in the cells of resected stomach carcinomas (n=52) hyperexpression of this marker was revealed immunohistochemically in 23% of cases. These cases were represented by the tumours with histological pattern of adenocarcinoma (intestinal type). In the tumours of diffuse type HER2/neu hyperexpression was not revealed. The obtained results testify to the economic feasibility of carrying out high-priced HER2/neu hyperexpression screening to make a decision about the target therapy with gerceptin first of all in the tumours with histological pattern of adenocarcinoma.

В последние десятилетия проблема первично-множественных злокачественных опухолей (ПМЗО) приобрела особое значение в связи с наблюдаемым повышением их частоты [1]. Это в полной мере относится к

опухолям желудочно-кишечного тракта [2, 3]. В практическом плане целесообразен поиск критериев возникновения второй опухоли при синхронном раке на основании морфологической оценки первой опухоли. Известно, что у членов «раковых семей» ПМЗО встречаются чаще, чем в популяции. Считается, что в случаях с ПМЗО имеет место нестабильность генной структуры [4]. На наш взгляд, при поиске прогностических критериев возникновения второй опухоли пер-

Адрес для корреспонденции: г.Минск, ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования»; e-mail: andrei_krilov@mail.ru, тел. моб.: 8(029) 614-87-41 – Крылов А.Ю.

спективно исследование маркёров апоптоза и пролиферации. Работы по исследованию экспрессии Ki-67, p53, Bcl 2 при раке желудка единичны и посвящены прогнозированию его течения [5], а также изучению канцерогенеза [6].

Особое место при раке желудка занимают исследования экспрессии HER2/neu у больных раком желудка в плане возможности использования герцептина для лечения этого заболевания [7], так как высокая эффективность этого препарата доказана при HER2/neu - положительных карциномах молочной железы. Исследования экспрессии этого маркёра при раке желудка немногочисленны и довольно противоречивы. По данным разных авторов, в различных регионах мира ее частота варьирует в широких пределах (Япония – 23% [8]; Европа – 91% [9], 13% [10]; Корея – 16% [11]). Учитывая относительную немногочисленность исследований, посвященных экспрессии HER2/neu при раке желудка и их неоднозначные результаты, а также перспективы в плане лечения рака желудка герцептином, следует продолжить определение этого протеина при раке желудка, в том числе при первично-множественных злокачественных опухолях у больных раком желудка.

Целью данного исследования явилось изучение иммуногистохимических особенностей синхронного первично-множественного рака желудка на основании оценки экспрессии в клетках карциномы Ki-67, p53, Bcl 2, а также проведение клинико-морфологического анализа экспрессии HER2/neu при раке желудка.

Методы

Материалом для исследования явился 21 случай резецированного желудка у больных первично-множественным синхронным раком, где первой опухолью являлся рак желудка, а второй – рак толстой кишки. Эти случаи отобраны из республиканского канцер-регистра за 1997-2007 гг. В качестве контрольной группы использовано 21 наблюдение рака желудка с пятилетней выживаемостью, без рецидивов и множественности (Т3) после резекции желудка. Клинико-морфологический анализ экспрессии Her2/neu проведен в 52 случаях впервые выявленного рака желудка после резекции.

Микроскопический анализ операционного материала проведен в соответствии с гистологическими классификациями ВОЗ (2000) и Lauren (1965). Гистологический вариант рака определялся по наименее дифференцированному компоненту опухоли.

В работе использованы стандартные окраски гистологических препаратов (гематоксилин и эозин), иммуногистохимические маркёры Ki-67 (клон MIB 1), p53 (клон DO-7), Bcl 2 (клон 124), Her2/neu (клон 1D5), в качестве визуализирующей системы использовали набор LSAB-2 корпорации DAKO.

Степень выраженности экспрессии маркеров Ki-67, p53, Bcl-2 определялась в процентном соотношении на тысячу клеток в разных полях зрения.

Степень выраженности экспрессии HER2/neu оценивали по трем градациям на основании данных литературы, посвященной его изучению при раке желудка [12, 13]. Экспрессию HER2/neu оценивали как 3+ при сильном окрашивании мембран у более 10% опухолевых клеток. 2+ соответствовало слабой или умеренной окраске полной окружности клеточных мембран 10% или более опухолевых клеток. Степень 1+ выставлялась при неполном окрашивании мембран у 10% и более клеток карциномы. Степень 0 соответствовала наблюдениям, где мембранное окрашивание было у менее чем у 10% клеток или отсутствовало. Степени 2+ и 3+ классифицировались как гиперэкспрессия HER2/neu.

Статистический анализ результатов исследования был выполнен с использованием аналитического пакета Statistica 7.0. Для проверки достоверности различий изучаемых признаков в независимых выборках - U-тест Манна-Уитни (Mann-Whitney). При необходимости сравнения частот встречаемости признаков в различных группах использовали тест χ^2 , а при малом ($n < 10$) размере сравниваемых групп – точный тест Фишера (Fisher's exact test).

Результаты и обсуждение

Нами был исследован 21 случай синхронного рака желудка (12 случаев карцином кишечного и 9 диффузного типа рака желудка, классифицированных по Lauren). Контрольную груп-

пу составил 21 случай рака желудка с пятилетней выживаемостью, без рецидивов и множественности (Т3). По гистологическому типу она была подобрана в соответствии с изучаемой группой (12 случаев кишечного и 9 случаев диффузного типа рака желудка). Результаты иммуногистохимического исследования экспрессии Ki-67, p53, Bcl 2 приведены в таблице 1.

Анализ данных таблицы 1 показывает, что значение маркера пролиферации Ki67 и маркера апоптоза Bcl 2 для клеток синхронного рака желудка достоверно выше, чем в контрольной группе ($p < 0,0001$ и $p = 0,0015$ соответственно). Значение иммуногистохимического маркера p53 в клетках синхронного рака желудка было выше, чем в контрольной группе, однако различия статистически не достоверны ($p > 0,05$).

Экспрессия Her2/neu в клетках карцином желудка в случаях синхронных поражений отмечалась как 1+ в 5 наблюдениях, в остальных – не наблюдалась. В отдельных случаях присутствовало фоновое очаговое цитоплазматическое окрашивание. Гиперэкспрессия в клетках синх-

ронного рака желудка не наблюдалась ни в одном случае.

В контрольной группе гиперэкспрессия Her2/neu была выявлена в 7 случаях (16%). Все они гистологически были представлены аденокарциномами G 2 (кишечный тип рака желудка) (рис. 1).

Учитывая возможную перспективность лечения герцептином рака желудка с гиперэкспрессией Her2/neu, иммуногистохимически было исследовано 52 случая вновь выявленного рака желудка после резекции и был проведен клинико-морфологический анализ.

Средний возраст больных 64,7 лет, причем у женщин он составлял 68,1 лет, а у мужчин – 62 года. Мужчины – 29 случаев, женщины – 23. Локализация опухоли согласно МКБ была следующей: гастроэзофагальное сочленение – 1 случай, тело желудка – 16 случаев, привратника – 23 случая, привратник – 12 случаев.

Гиперэкспрессия Her2/neu (2+, 3+) наблюдалась в 12 случаях рака желудка, что составило

Таблица 1

Иммуногистохимические показатели экспрессии Ki-67, p53, Bcl 2 у пациентов с синхронным раком желудка (СРЖ) и контрольной группы (РЖ, %)

Показатель	Группа		Значимость (p)
	СРЖ n = 21	К n = 21	
Ki 67	40,0 (29,0÷51,0)	5,0 (4,0÷10,0)	$p < 0,0001$
p53	17,0 (3,0÷41,0)	4,0 (3,0÷30,0)	$p > 0,05$
Bcl 2	13,0 (2,0÷37,0)	1,0 (0,0÷4,0)	$p = 0,015$

Примечание: СРЖ – синхронный рак желудка, К – контрольная группа.

Таблица 2

Анализ экспрессии Her2/neu у пациентов с синхронным раком желудка (СРЖ) и контрольной группы (РЖ)

Экспрессия Her2/neu	СРЖ		РЖ		χ^2	p
	Абс.	%	Абс.	%		
0	16	76,2	12	57,1	8,4	0,004
1+	5	23,8	2	9,5		
2+	0	0	3	14,3		
3+	0	0	4	19,1		
Всего	21	100	21	100		

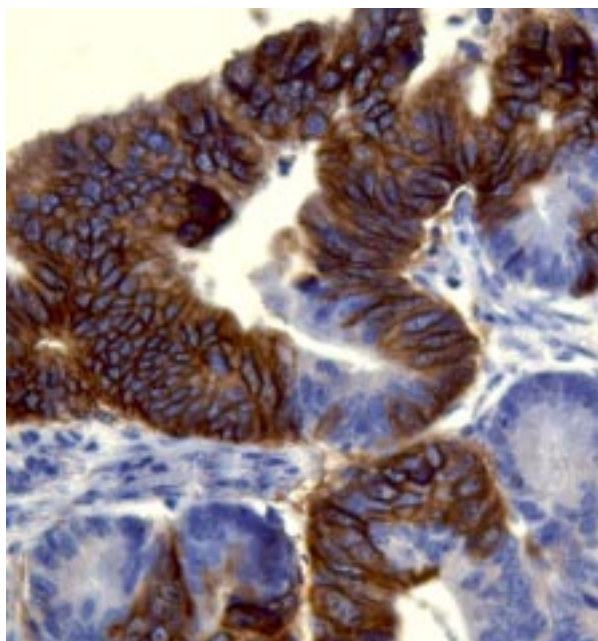


Рис. 1. Гиперэкспрессия Her2/neu в большинстве клеток аденокарциномы (мембранное окрашивание, степень 3+), увеличение x400.

23% от всех наблюдений. Причём в 4 случаях опухоль локализовалась в теле желудка, что составило – 33,3%, в антральном отделе желудка в 7 случаях (58,3%), в области гастроэзофагального сочленения в 1 случае (8,3%).

В отдельных исследованиях экспрессии Her2/neu при раке желудка отмечено, что для опухолей гастроэзофагального сочленения характерен более высокий процент по сравнению с другими локализациями рака желудка [10, 15]. В материале нашего исследования был всего 1 случай наблюдения карциномы гастроэзофагального сочленения, гистологически представленный аденокарциномой G 2, в котором отмечалась гиперэкспрессия Her2/neu (2+).

По макроскопической форме язва-рак наблюдался в 18 случаев, утолщение слизистой – 13 случаев, блюдцеобразный – 11 случаев, полиповидный – 6, в 4 случаях форму роста установить не представилось возможным.

26 случаев было представлено диффузным типом рака (по классификации Lauren), 26 – кишечным типом. Все случаи диффузного рака были представлены перстневидно-клеточным раком желудка, либо недифференцированным раком. Кишечный тип был представлен аденокарциномами различного грейда с преобладанием G 2.

Результаты исследования экспрессии HER2/neu представлены в таблице 3.

Анализ данных, представленных в таблице 2, показывает, что классическая гиперэкспрессия 3+ была выявлена в 4 случаях, 2+ – в 8 случаях у пациентов с аденокарциномой G2. В процентном соотношении гиперэкспрессия Her2/neu (3+, 2+) выявлялась в 23% случаев аденокарцином. В диффузных раках экспрессия данного маркера выявлена не была. В относительно немногочисленных исследованиях экспрессии Her2/neu при раке желудка в зависимости от гистологического типа показано, что гиперэкспрессия чаще встречается при кишечном типе рака желудка по сравнению с диффузным (21% и 2% [14], 16% и 7% [10], 34% и 6% [15]).

Заключение

1. Установлено, что значение показателей пролиферации Ki67 и апоптоза Bcl 2 для клеток синхронного рака желудка, сочетающегося с раком толстой кишки, достоверно выше, чем в контрольной группе.

2. При анализе выраженности экспрессии Her2/neu в клетках карциномы желудка установлено, что он экспрессируется в 23% случаев. При этом гиперэкспрессия Her2/neu определялась в

Таблица 3

**Анализ экспрессии Her2/neu у пациентов с впервые выявленным раком желудка (Т3)
в зависимости от типа карциномы**

Экспрессия Her2/neu	Тип рака				χ^2	Р
	Кишечный		Диффузный			
	Абс.	%	Абс.	%		
0	12	46,15	21	80,8	15,6	0,0001
1	2	7,69	5	19,2		
2	8	30,78	0	0		
3	4	15,38	0	0		
Всего	26	100	26	100		

опухолях с гистологическим строением аденокарциномы. Случаев гиперэкспрессии в клетках диффузного типа рака желудка нами не выявлено.

3. Полученные нами данные предполагают необходимость проведения дорогостоящего скрининга для выявления гиперэкспрессии Her2/neu с целью таргетной терапии герцептином, прежде всего для опухолей с гистологическим диагнозом аденокарцинома.

Литература

1. Чиссов, В.Н. Первично-множественные злокачественные опухоли. / В.Н. Чиссов, А.Х. Трахтенберг // М.: Медицина. – 2000. – 336 с.
2. Федоров, В.Д. Первично-множественные злокачественные опухоли пищеварительного тракта / В.Д. Федоров, Б.Д. Савчук, В.А. Косарев, А.И. Тугаринов // Сов. Мед. – 1979. - №8. – С. 57-61.
3. Kaibara, N. Patients with multiple primary gastric cancers tend to develop second primaries in organs other than stomach / Maeta M., Jkegushi M. // Surg. Today. – 1993. – Vol. 23, № 2. – P. 186-189.
4. Гарькавцева, Р.Ф. Генетика рака желудочно-кишечного тракта / Р.Ф. Гарькавцева, Т.П. Казубская, Н.Ф. Белев, В.Ю. Сельчук // Современная онкология. – 2001. - Т. 3, № 4. - С. 1-6.
5. Зорькин, В.Т. Экспрессия ki-67 и p53 при дисплазии и раке желудка / В.Т. Зорькин, В.В. Лазарев, А.Ф. Климачев и др. // Архив патологии. – 2006. – Т. 68, № 3. – С. 6-10.
6. Ryo Wada, Mucin phenotypic and p53 gene abnormality of gastric super-minute well-differentiated adenocarcinoma: Re-evaluation with relationship between histogenesis of well-differentiated adenocarcinoma and intestinal metaplasia in distal stomach Toshikazu / Ryo Wada, Yamaguchi, Takayuki Tanizaki // Journal of Carcinogenesis - 2005, N 4. - P. 14-21.
7. Ганьшина, И.П. Герцептин: новые перспективы в лечении рака / И.П. Ганьшина, Е.В. Степанова // Фарматека - 2002. № 12.
8. Yano T, Expression of HTR2 in gastric cancer: comparison between protein expression and gene amplification using a new commercial kit. / Yano T, Ochiai A, Doi T et al. // J Clin Oncol - 2004; 22: 14S (Abstr 4053).
9. Allgayer H, C-erbB-2 is of independent prognostic relevance in gastric cancer and is associated with the expression of tumor associated protease systems / Allgayer H, J Babic R, Gruetzner KU et al. // Clin Oncol – 2000. – N 18. P. 2201-2209.
10. Gravalos C, Marguez A, Garcia-Carbonero R et al. Correlation between Her2/neu overexpression / amplification and clinicopathological parameters in advanced gastric cancer patients: a prospective study 2007 Gastrointestinal Cancers Symposium. 130 (Abstr 89).
11. Park DI, Yun JW, Park JH et al. HER2/neu amplification is an independent prognostic factor in gastric cancer. Dig Dis Sci 2006; 51: 1371-1379.
12. Mikihiro Kimura, Usefulness and Limitation of Multiple Endoscopic Biopsy Sampling for Epidermal Growth Factor Receptor and c-erbB-2 Testing in Patients with Gastric Adenocarcinoma / Mikihiro Kimura et al // Jap J Clin Oncol 2005. – N 35(6). P. 324-331.
13. S.D.Xie, HER2/neu protein expression in gastric cancer is associated with poor survival / S.D.Xie, C.Y. Xu, J.G. Shen, Z.N. Jiang, J.Y. Shen and L.B. // Wang Molecular medicine reports - 2009. N 2. P. 943-946.
14. Tanner M, Amplification of HER2 in gastric carcinoma: association with topoisomerase IIa gene amplification, intestinal type, poor prognosis and sensitivity to trastuzumab / Tanner M, Hollmen M, Junttila TT et al. // Ann Oncol – 2005/ N 16. P. 273-278.
15. Lordick, HER2-positive advanced gastric cancer: similar HER2-positivity levels to breast cancer / Lordick, Bang YJ, Kang YK et al. // Eur J Cancer – 2007. N 5(4). P. 271 (Abstr 3541).

Поступила 22.01.2011 г.

Принята в печать 18.02.2011 г.